

PCT

REC'D 03 DEC 1996

WIPO PCT

## RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire ST 94065	POUR SUITE A DONNER Voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR 95/ 01002	Date du dépôt international (jour/mois/année) 26/07/1995	Date de priorité (jour/mois/année) 12/08/1994
Classification internationale des brevets (CIB) ou classification nationale et CIB C12N15/86		
Déposant RHONE-POULENC RORER S.A. et al.		

1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.


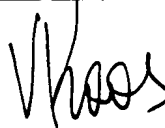
2. Ce RAPPORT comprend 8 feuilles, y comprise la présente feuille de couverture.

☐ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent \_\_\_\_\_ feuilles.

3. Le présent rapport contient des indications et les pages correspondantes relatives aux points suivants:

- I ☒ Base du rapport
- II ☐ Priorité
- III ☐ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- IV ☐ Absence d'unité de l'invention
- V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- VI ☐ Certains documents cités
- VII ☒ Irrégularités dans la demande internationale
- VIII ☒ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire international 29/02/1996	Date d'achèvement du présent rapport 28 NOV 1996
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international  Office Européen des Brevets D-80298 Munich Tel. (+ 49-89) 2399-0, Tx: 523656 epmu d Fax: (+ 49-89) 2399-4465	Fonctionnaire autorisé  V. Kaas N° de Téléphone



I. Base du rapport

1. Le présent rapport a été rédigé sur la base des éléments ci-après (Les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées dans le présent rapport comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications.):

☒ de la demande internationale telle qu'initialement déposée.

☐ de la description, pages \_\_\_\_\_, telles qu'initialement déposées,  
pages \_\_\_\_\_, déposées avec la demande d'examen  
préliminaire international,  
pages \_\_\_\_\_, déposées sous couvert d'une lettre  
du \_\_\_\_\_,  
pages \_\_\_\_\_, déposées sous couvert d'une lettre  
du \_\_\_\_\_,

☐ des revendications, nos. \_\_\_\_\_, telles qu'initialement déposées,  
nos. \_\_\_\_\_, telles que modifiées en vertu de  
l'article 19,  
nos. \_\_\_\_\_, déposées avec la demande d'examen  
préliminaire international,  
nos. \_\_\_\_\_, déposées sous couvert d'une lettre  
du \_\_\_\_\_,  
nos. \_\_\_\_\_, déposées sous couvert d'une lettre  
du \_\_\_\_\_,

☐ des dessins, feuilles/fig \_\_\_\_\_, telles qu'initialement déposées,  
feuilles/fig \_\_\_\_\_, déposées avec la demande d'examen  
préliminaire international,  
feuilles/fig \_\_\_\_\_, déposées sous couvert d'une lettre  
du \_\_\_\_\_,  
feuilles/fig \_\_\_\_\_, déposées sous couvert d'une lettre  
du \_\_\_\_\_,

2. Les modifications ont entraîné l'annulation

☐ de la description, pages \_\_\_\_\_.



## RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

PCT/FR95/01002

[ ] des revendications, nos. \_\_\_\_\_.

[ ] des dessins, feuilles/fig. \_\_\_\_\_.

3. [ ] Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé (règle 70.2.c)).

4. Observations complémentaires, le cas échéant:



V. Déclaration motivée selon l'article 35.2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

## 1. DECLARATION

Nouveauté	Revendications 1-26 _____	OUI
	Revendications _____	NON
Activité inventive	Revendications _____	OUI
	Revendications 1-26 _____	NON
Possibilité d'application industrielle	Revendications 1-26 _____	OUI
	Revendications _____	NON

## 2. CITATIONS ET EXPLICATIONS

- 1) Les documents (D) suivants ont été pris en compte pour l'établissement du rapport d'examen préliminaire:

D1 : Nucleic Acid Research, vol. 21, 1993, pages  
1607-1612.

D2 : WO-93/20195

Ref.2 : Eur.J. Biochem. 1988, pages 435-441

- 2) La présente demande ne répond pas au critère figurant à l'Article 33(3) PCT, l'objet des revendications 1 à 26 n'impliquant pas d'activité inventive (Règle 65(1)(2) PCT).

Le document D1, qui est considéré comme l'état de la technique le plus proche, décrit un adénovirus recombinant défectif porteur d'ADNc codant pour la catalase humaine et son utilisation pour le transfert de l'ADNc à l'intérieur des cellules endothéliales en vue d'augmenter la protection anti-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracellulaire.





## RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

L'objet des revendications en instance ne diffère de D1 qu'en ce que l'ADNc inséré dans l'adénovirus code pour la glutathion peroxidase (GPx).

Le rôle de la glutathion peroxidase dans les mécanismes de défense anti-oxydants ainsi que ses propriétés pharmacologiques, notamment dans le traitement des maladies neurodégénératives, étaient connus avant la date de priorité de la demande en instance (cf. D2, page 3, lignes 2-4; page 4, second paragraphe). La séquence et la location du gène codant pour les glutathion peroxidase humaine, bovine et murine ainsi que les cDNA correspondants étaient également connus (cf. D2, Figure 2 et page 30-32, points 5 et 6).

L'objet des revendications 1 à 26 résulte donc simplement du remplacement dans D1 de la séquence codant pour la catalase par une séquence connue codant pour une autre enzyme ayant la même fonction, la glutathion peroxidase (GPx), en vue de la même utilisation de l'adénovirus ainsi obtenu (l'expression stable et localisée de l'enzyme à l'intérieur de la cellule) et est, par conséquent, considéré comme évident pour la personne du métier. Celle-ci aurait d'autant plus été tentée d'effectuer ce remplacement qu'elle savait par le document Ref. 2, fournie par la Demanderesse et annexée au présent rapport, que dans des conditions physiologiques, GPx possède des propriétés protectrices supérieures à la catalase (cf. Ref. 2, page 439, colonne de droite, lignes 5-9; page 440, lignes 28-30, 40-44 et 47-50).

De plus, étant donné que ce remplacement ne semble résulter en aucun avantage autre que ceux auxquels se serait logiquement attendu la personne du métier connaissant par D1 les avantages liés à l'utilisation des adénovirus comme vecteurs pour le transfert d'un



gène étranger et par Ref. 2 les propriétés protectrices supérieure de GPx par rapport à la catalase, l'adénovirus ainsi obtenu, son utilisation thérapeutique ainsi qu'une cellule infectée par un tel adénovirus et un implant conventionnel comprenant plusieurs de ces cellules sont considérés comme dépourvus d'activité inventive.

L'objet des revendications 1 à 26 ne satisfait donc pas au critère énoncé par l'Article 33(3) PCT.

- 3) L'objet des revendications 1-26 trouve une application industrielle dans le domaine de la pharmacologie (Article 33(4) PCT).
- 4) Durant la procédure d'examen préliminaire international, la Demanderesse a fourni deux documents qui sont annexés au présent rapport,  
Réf. 1: Free Radic. Biol. Med. 17, 1994, pages 235-248  
Réf. 2: Eur. J. Biochem., 1988, pages 435-441



---

VII. Irrégularités dans la demande internationale

---

Les irrégularités suivantes, concernant la forme ou le contenu de la demande internationale, ont été constatées:

Les documents D1, D2 et Ref.2 n'ont pas été cités dans la description et l'état de la technique qu'ils renferment n'a pas non plus été discuté. Les dispositions de la Règle 5.1(a)(ii) PCT ne sont donc pas observées.



---

VIII. Observations relatives à la demande internationale

---

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description:

La demande ne remplit pas les conditions énoncées à l'Article 6 PCT, la revendication 16 n'étant pas claire.

Cette revendication est plus large que la revendication 15 dont elle dépend car elle dresse une liste de maladies dont la plupart ne sont manifestement pas des maladies neurodégénératives que la revendication 15 est limitée au traitement des maladies neurodégénératives.







## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :</b> <b>C12N 15/86, A61K 48/00, C12N 9/08, A61K 38/43</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale: WO 96/05320</b> <b>(43) Date de publication internationale: 22 février 1996 (22.02.96)</b>
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR95/01002 <b>(22) Date de dépôt international:</b> 26 juillet 1995 (26.07.95) <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 94/09982 12 août 1994 (12.08.94) FR <b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR). <b>(72) Inventeurs; et</b> <b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement):</b> BARKATS, Martine [FR/FR]; 7, Rue Nicolas-Mouël, F-75005 Paris (FR). MALLET, Jacques [FR/FR]; 18, rue Charcot, F-75013 Paris (FR). REVAH, Frédéric [FR/FR]; Bâtiment Flandre 2, 49, rue de Catenay, F-92160 Antony (FR). <b>(74) Mandataire:</b> LE COUPANEC, Pascale; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, Avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR).		<b>(81) Etats désignés:</b> AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, EE, FI, GE, HU, IS, JP, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TJ, TT, UA, UG, US, UZ, VN, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), brevet ARIPO (KE, MW, SD, SZ, UG).  <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
<b>(54) Title: ADENOVIRUS COMPRISING A GENE CODING FOR GLUTATHION PEROXIDASE</b> <b>(54) Titre: ADENOVIRUS COMPRENANT UN GENE CODANT POUR LA GLUTATHION PEROXYDASE</b> <b>(57) Abstract</b> <p>The present invention relates to a defective recombinant adenovirus comprising at least a DNA sequence coding for all or an active part of glutathion peroxidase or a derivative thereof. It also relates to their utilisation in therapy and to the corresponding pharmaceutical compositions.</p> <b>(57) Abrégé</b> <p>La présente invention se rapporte à un adénovirus recombinant défectif comprenant au moins une séquence d'ADN codant pour tout ou une partie active de la glutathion peroxydase ou un de ses dérivés. Elle vise également leur utilisation en thérapie et des compositions pharmaceutiques correspondantes.</p>		

### **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

ADENOVIRUS COMPRENANT UN GENE CODANT POUR LA GLUTATHION  
PEROXYDASE

La présente invention concerne des adénovirus recombinants comprenant une  
séquence d'ADN codant pour la glutathion peroxydase et ses utilisations en thérapie  
5 génique.

La glutathion peroxydase est une des enzymes qui intervient activement dans la  
régulation des concentrations en radicaux libres dérivés de l'oxygène, formés lors de  
divers processus physiologiques ou pathologiques.

Normalement, la formation de ces radicaux, hautement réactifs, comme l'anion  
10 superoxyde, le peroxyde d'hydrogène et le radical hydroxyle est contrôlée comme suit:  
l'anion superoxyde est rapidement converti en peroxyde d'hydrogène, grâce à la  
superoxyde dismutase, puis ce peroxyde d'hydrogène est converti en oxygène et eau,  
par la catalase ou en particulier la glutathion peroxydase.

Habituellement, ces enzymes sont présentes dans pratiquement tous les tissus.  
15 Toutefois, sous certaines conditions, ces mécanismes de régulation ne sont pas  
totalement efficaces. En particulier, il peut exister un déséquilibre entre leurs  
concentrations respectives, par exemple une concentration excessive en superoxyde  
dismutase comparativement à la quantité disponible de glutathion peroxydase, ce qui  
conduit à une production pathologique de peroxyde d'hydrogène et de radicaux libres  
20 (radicaux hydroxyle en particulier).

Ces radicaux libres peuvent directement induire une peroxydation des lipides  
menbranaires, inactiver les enzymes en peroxydant leurs groupements sulfhydryle,  
dépolymériser des polysaccharides et/ou endommager des acides nucléiques,  
entraînant dans tous les cas des pathologies graves. Ils peuvent être ainsi à l'origine  
25 d'inflammations, d'emphysèmes, de néoplasmes et/ou de rétinopathies. Ils semblent  
également être impliqués dans l'athérosclérose, l'ischémie cérébrale, les traumatismes  
crâniens, le syndrome de détresse respiratoire, les maladies cardiovasculaires, le  
diabète, la cirrhose du foie et la formation de cataractes ainsi que dans le processus de  
vieillesse. Les radicaux libres seraient également liés au processus d'apoptose et  
30 pourraient intervenir dans la mort cellulaire accompagnant le syndrome  
d'immunodéficience acquise (SIDA), [The J. of Biol. Chem., 269, 2(14), 798-801,  
(1994).] Plus récemment, il a été mis en évidence que des réactions entre ces radicaux  
ou avec des neurotransmetteurs conduisaient à la formation de neurotoxines  
endogènes. Les radicaux libres sont donc également impliqués dans des pathologies  
35 neurologiques comme la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la sclérose  
latérale amyotrophique (ALS) et/ou la trisomie 21.

En conséquence, il serait particulièrement précieux de disposer aujourd'hui de médicaments qui puissent accroître ou réguler la concentration en glutathion peroxydase au niveau de l'organisme et qui soient donc efficaces pour traiter l'ensemble des pathologies précitées.

- 5 La présente invention réside précisément dans la mise au point de vecteurs particulièrement efficaces pour délivrer in vivo et de manière localisée, des quantités thérapeutiquement actives du gène spécifique codant pour la glutathion peroxydase ou l'un de ses dérivés.

- 10 Dans la demande correspondante n° PCT/EP93/02519, il a été montré que les adénovirus pouvaient être utilisés comme vecteur pour le transfert d'un gène étranger in vivo dans le système nerveux et l'expression de la protéine correspondante.

La présente invention concerne plus particulièrement des constructions nouvelles, particulièrement adaptées et efficaces pour contrôler l'expression de la glutathion peroxydase.

- 15 Plus précisément, elle se rapporte à un adénovirus recombinant comprenant une séquence d'ADN propre à contrôler l'expression d'une glutathion peroxydase, son utilisation pour des traitements thérapeutiques et/ou la prévention de diverses pathologies.

- 20 La demanderesse a ainsi mis en évidence qu'il est possible de construire des adénovirus recombinants contenant une séquence codant pour une glutathion peroxydase, d'administrer ces adénovirus recombinants in vivo, et que cette administration permet une expression stable et localisée de quantités thérapeutiquement actives de la glutathion peroxydase in vivo.

- 25 Un premier objet de l'invention réside donc dans un adénovirus recombinant déficient comprenant au moins une séquence d'ADN codant pour tout ou une partie active d'une glutathion peroxydase ou l'un de ses dérivés.

- 30 Au sens de la présente invention on entend désigner par glutathion peroxydase toute enzyme possédant l'activité de la glutathion peroxydase. A titre illustratif de ces enzymes on peut en particulier citer chez l'homme les glutathions peroxydases, GPX1, GPX2, GPX3 et GPX4. Les GPX1 et GPX4 sont exprimées dans la plupart des tissus avec une nette prépondérance dans les érythrocytes, le foie et le rein, pour GPX1 (Chambers et al; EMBO J 5: 1221-1227 (1986)) et les testicules pour GPX4 [Roveri et al; J. Biol. Chem. 267:6142-6146 (1992)]. GPX3 est produite dans

le rein, le poumon, le coeur, le sein, le placenta ainsi que dans le foie (Chu et al. Blood 79: 3233\_3238 (1992)) quant à la GPX2, elle a principalement été mise en évidence dans les tissus gastrointestinaux et dans le foie [Chu et al. J. Biol. Chem. 268: 2571-257 (1993)].

5           La glutathion peroxydase produite dans le cadre de la présente invention peut être une glutathion peroxydase humaine ou animale. Il peut en particulier s'agir de la glutathion peroxydase bovine.

          La séquence d'ADN codant pour la glutathion peroxydase, utilisée dans le cadre de la présente invention peut être un ADNc, un ADN génomique (ADNg), ou  
10       une construction hybride consistant par exemple en un ADNc dans lequel seraient insérés un ou plusieurs introns. La séquence nucléique de l'ADNc codant pour la glutathion peroxydase humaine a été décrite par [Mullenbach et al., Oxy-Radicals in Molecular Biology and Pathology, 313-326, (1988)]. Il peut également s'agir de séquences synthétiques ou semisynthétiques.

15           De manière particulièrement avantageuse, on utilise un ADNc ou un ADNg.

          Selon un mode préféré de l'invention, il s'agit une séquence d'ADN génomique (ADNg) codant pour une glutathion peroxydase. Son utilisation peut permettre une meilleure expression dans les cellules humaines.

20           Bien entendu, préalablement à son incorporation dans un vecteur adénovirus selon l'invention, la séquence d'ADN peut être avantageusement modifiée, par exemple par mutagenèse dirigée, en particulier pour l'insertion de sites de restriction appropriés. Les séquences décrites dans l'art antérieur ne sont en effet pas construites pour une utilisation selon l'invention, et des adaptations préalables peuvent s'avérer nécessaires, pour obtenir des expressions importantes.

25           Au sens de la présente invention, on entend par dérivé, toute séquence obtenue par modification et codant pour un produit conservant l'une au moins des propriétés biologiques de la glutathion peroxydase. Par modification, on doit entendre toute mutation, substitution, délétion, addition ou modification de nature génétique et/ou chimique. Ces modifications peuvent être réalisées par les techniques connues de  
30       l'homme du métier (voir techniques générales de biologie moléculaire ci-après). Les dérivés au sens de l'invention peuvent également être obtenus par hybridation à partir de banques d'acides nucléiques, en utilisant comme sonde la séquence native de la glutathion peroxydase ou un fragment de celle-ci.

Ces dérivés sont notamment des molécules ayant une plus grande affinité pour leurs sites de fixation, des séquences permettant une expression améliorée in vivo, des molécules présentant une plus grande résistance aux protéases, des molécules ayant une efficacité thérapeutique plus grande ou des effets secondaires moindres, ou éventuellement de nouvelles propriétés biologiques.

Parmi les dérivés préférés, on peut citer plus particulièrement les variants naturels, les molécules dans lesquelles un ou plusieurs résidus ont été substitués, les dérivés obtenus par délétion de régions n'intervenant pas ou peu dans l'interaction avec les sites de liaison considérés ou exprimant une activité indésirable, et les dérivés comportant par rapport à la séquence native des résidus supplémentaires, tels que par exemple un signal de sécrétion et/ou un peptide de jonction.

La séquence d'ADN, codant pour tout ou partie d'une glutathion peroxydase ou l'un de ses dérivés, peut également être une séquence antisens, dont l'expression dans la cellule cible permet de contrôler l'expression de cette enzyme. Préférentiellement, la séquence d'ADN hétérologue comporte un gène codant pour un ARN antisens capable de contrôler la traduction de l'ARNm correspondant. La séquence antisens peut être tout ou seulement une partie de la séquence d'ADN, codant pour une glutathion peroxydase, insérée dans l'orientation inverse dans le vecteur selon l'invention.

Selon un mode de réalisation de l'invention, la séquence d'ADN, codant pour une glutathion peroxydase ou l'un de ses dérivés, peut également intégrer un signal de sécrétion permettant de diriger la glutathion peroxydase synthétisée dans les voies de sécrétion des cellules infectées. De cette manière, la glutathion peroxydase synthétisée est avantageusement libérée dans les compartiments extracellulaires.

Avantageusement, la séquence codant pour la glutathion peroxydase est placée sous le contrôle de signaux permettant son expression dans les cellules cibles. Préférentiellement, il s'agit de signaux d'expression hétérologues, c'est-à-dire de signaux différents de ceux naturellement responsables de l'expression de la glutathion peroxydase. Il peut s'agir en particulier de séquences responsables de l'expression d'autres protéines, ou de séquences synthétiques. Notamment, il peut s'agir de séquences promotrices de gènes eucaryotes ou viraux. Par exemple, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome de la cellule que l'on désire infecter. De même, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome d'un virus, y compris l'adénovirus utilisé. A cet égard, on peut citer par exemple les promoteurs E1A, MLP, CMV, LTR-RSV, etc. En outre, ces séquences d'expression peuvent être modifiées

par addition de séquences d'activation, de régulation, ou permettant une expression tissu-spécifique. Il peut en effet être particulièrement intéressant d'utiliser des signaux d'expression actifs spécifiquement ou majoritairement dans les cellules cibles, de manière à ce que la séquence d'ADN ne soit exprimée et ne produise son effet que  
5 lorsque le virus a effectivement infecté une cellule cible.

Dans un premier mode de réalisation particulier, l'invention concerne un adénovirus recombinant défectif comprenant une séquence d'ADNc ou ADN8 codant pour une glutathion peroxydase bovine sous le contrôle du promoteur LTR-RSV.

Dans un autre mode de réalisation particulier, l'invention concerne un  
10 adénovirus recombinant défectif comprenant une séquence d'ADNg codant pour la glutathion peroxydase humaine sous le contrôle du promoteur LTR-RSV.

Un mode particulièrement préféré de mise en oeuvre de la présente invention réside dans un adénovirus recombinant défectif comprenant les séquences ITR, une séquence permettant l'encapsidation, une séquence d'ADN codant pour la glutathion  
15 peroxydase humaine ou un dérivé de celle-ci sous le contrôle d'un promoteur permettant une expression majoritaire dans les tissus cibles et dans lequel le gène E1 et au moins un des gènes E2, E4, L1-L5 est non fonctionnel.

Les adénovirus défectifs selon l'invention sont des adénovirus incapables de se répliquer de façon autonome dans la cellule cible. Généralement, le génome des  
20 adénovirus défectifs utilisés dans le cadre de la présente invention est donc dépourvu au moins des séquences nécessaires à la réplication dudit virus dans la cellule infectée. Ces régions peuvent être soit éliminées (en tout ou en partie), soit rendues non-fonctionnelles, soit substituées par d'autres séquences et notamment par la séquence d'ADN codant pour la glutathion peroxydase.

25 Préférentiellement, le virus défectif de l'invention conserve les séquences de son génome qui sont nécessaires à l'encapsidation des particules virales. Encore plus préférentiellement, comme indiqué ci-avant, le génome du virus recombinant défectif selon l'invention comprend les séquences ITR, une séquence permettant l'encapsidation, le gène E1 non fonctionnel et au moins un des gènes E2, E4, L1-L5  
30 non fonctionnel.

Il existe différents sérotypes d'adénovirus, dont la structure et les propriétés varient quelque peu. Parmi ces sérotypes, on préfère utiliser dans le cadre de la présente invention les adénovirus humains de type 2 ou 5 (Ad 2 ou Ad 5) ou les adénovirus d'origine animale (voir demande FR 93 05954). Parmi les adénovirus  
35 d'origine animale utilisables dans le cadre de la présente invention on peut citer les

adénovirus d'origine canine, bovine, murine, [exemple : Mav1, Beard et al., Virology 75 (1990) 81], ovine, porcine, aviaire ou encore simienne (exemple : SAV). De préférence, l'adénovirus d'origine animale est un adénovirus canin, plus préférentiellement un adénovirus CAV2 [souche manhattan ou A26/61 (ATCC VR-800) par exemple]. De préférence, on utilise dans le cadre de l'invention des adénovirus d'origine humaine ou canine ou mixte.

Les adénovirus recombinants défectifs selon l'invention peuvent être préparés par toute technique connue de l'homme du métier (Levrero et al., Gene 101 (1991) 195, EP 185 573; Graham, EMBO J. 3 (1984) 2917). En particulier, ils peuvent être préparés par recombinaison homologue entre un adénovirus et un plasmide portant entre autre la séquence d'ADN codant pour la glutathion peroxydase. La recombinaison homologue se produit après co-transfection desdits adénovirus et plasmide dans une lignée cellulaire appropriée. La lignée cellulaire utilisée doit de préférence (i) être transformable par lesdits éléments, et (ii), comporter les séquences capables de compléter la partie du génome de l'adénovirus défectif, de préférence sous forme intégrée pour éviter les risques de recombinaison. A titre d'exemple de lignée, on peut mentionner la lignée de rein embryonnaire humain 293 (Graham et al., J. Gen. Virol. 36 (1977) 59) qui contient notamment, intégrée dans son génome, la partie gauche du génome d'un adénovirus Ad5 (12 %). Des stratégies de construction de vecteurs dérivés des adénovirus ont également été décrites dans les demandes n° FR 93 05954 et FR 93 08596 qui sont incorporées à la présente demande par référence.

Ensuite, les adénovirus qui se sont multipliés sont récupérés et purifiés selon les techniques classiques de biologie moléculaire, comme illustré dans les exemples.

Les propriétés particulièrement avantageuses des vecteurs de l'invention découlent notamment de la construction utilisée (adénovirus défectif, délété de certaines régions virales), du promoteur utilisé pour l'expression de la séquence codant pour la glutathion peroxydase (promoteur viral ou tissu-spécifique de préférence), et des méthodes d'administration dudit vecteur, permettant l'expression efficace et dans les tissus appropriés de ladite enzyme.

La présente invention concerne également toute utilisation d'un adénovirus tel que décrit ci-dessus pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement et/ou à la prévention des pathologies précédemment citées. Plus



particulièrement, elle concerne toute utilisation de ces adénovirus pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement et/ou à la prévention des maladies neurodégénératives comme par exemple la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer, la sclérose latérale amyotrophique (ALS), et la trisomie 21. Ils peuvent  
5 être également avantageusement utilisés dans le traitement de l'athérosclérose, les maladies cardiovasculaires, la cirrhose du foie, le diabète, la formation de cataracte, l'ischémie cérébrale, les traumatismes crâniens, le syndrome de détresse respiratoire (ARDS), les maladies liées à une déficience immunitaires, les cancers ainsi que dans le processus de vieillissement.

10 La présente invention concerne également une composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs adénovirus recombinants défectifs tels que décrits précédemment. Ces compositions pharmaceutiques peuvent être formulées en vue d'administrations par voie topique, orale, parentérale, intranasale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, transdermique, etc. De préférence, les  
15 compositions pharmaceutiques de l'invention contiennent un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une formulation injectable, notamment pour une injection directe chez le patient. Il peut s'agir en particulier de solutions stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables.

20 A cet égard, l'invention concerne également une méthode de traitement des maladies neurodégénératives comprenant l'administration à un patient d'un adénovirus recombinant tel que défini ci-avant. Plus particulièrement, l'invention concerne une méthode de traitement des maladies neurodégénératives comprenant l'administration stéréotaxique d'un adénovirus recombinant tel que défini ci-avant.

25 Les doses d'adénovirus recombinant défectif utilisées pour l'injection peuvent être adaptées en fonction de différents paramètres, et notamment en fonction du mode d'administration utilisé, de la pathologie concernée ou encore de la durée du traitement recherchée. D'une manière générale, les adénovirus recombinants selon l'invention sont formulés et administrés sous forme de doses comprises entre  $10^4$  et  $10^{14}$  pfu/ml, et de  
30 préférence  $10^6$  à  $10^{10}$  pfu/ml. Le terme pfu ("plaque forming unit") correspond au pouvoir infectieux d'une solution de virus, et est déterminé par infection d'une culture cellulaire appropriée, puis mesure, généralement après 48 heures, du nombre de plages de cellules infectées. Les techniques de détermination du titre pfu d'une solution virale sont bien documentées dans la littérature.

Un autre objet de l'invention concerne toute cellule de mammifère infectée par un ou plusieurs adénovirus recombinants défectifs tels que décrits ci-dessus. Plus particulièrement, l'invention concerne toute population de cellules humaines infectée par ces adénovirus. Il peut s'agir en particulier de fibroblastes, myoblastes, 5 hépatocytes, kératinocytes, cellules endothéliales, cellules Gliales, etc.

Les cellules selon l'invention peuvent être issues de cultures primaires. Celles-ci peuvent être prélevées par toute technique connue de l'homme du métier, puis mises en culture dans des conditions permettant leur prolifération. S'agissant plus particulièrement de fibroblastes, ceux-ci peuvent être aisément obtenus à partir de 10 biopsies, par exemple selon la technique décrite par Ham [Methods Cell.Biol. 21a (1980) 255]. Ces cellules peuvent être utilisées directement pour l'infection par les adénovirus, ou conservées, par exemple par congélation, pour l'établissement de banques autologues, en vue d'une utilisation ultérieure. Les cellules selon l'invention peuvent également être des cultures secondaires, obtenues par exemple à partir de 15 banques préétablies.

Les cellules en culture sont ensuite infectées par des adénovirus recombinants, pour leur conférer la capacité de produire de la glutathion peroxydase. L'infection est réalisée in vitro selon des techniques connues de l'homme du métier. En particulier, selon le type de cellules utilisé et le nombre de copies de virus par cellule 20 désiré, l'homme du métier peut adapter la multiplicité d'infection. Il est bien entendu que ces étapes doivent être effectuées dans des conditions de stérilité appropriées lorsque les cellules sont destinées à une administration in vivo. Les doses d'adénovirus recombinant utilisées pour l'infection des cellules peuvent être adaptées par l'homme du métier selon le but recherché. Les conditions décrites ci-avant pour l'administration 25 in vivo peuvent être appliquées à l'infection in vitro.

Un autre objet de l'invention concerne un implant comprenant des cellules mammifère infectées par un ou plusieurs adénovirus recombinants défectifs telles que décrites ci-dessus, et une matrice extracellulaire. Préférentiellement, les implants selon l'invention comprennent  $10^5$  à  $10^{10}$  cellules. Plus préférentiellement, ils en 30 comprennent  $10^6$  à  $10^8$ .

Plus particulièrement, dans les implants de l'invention, la matrice extracellulaire comprend un composé gélifiant et éventuellement un support permettant l'ancrage des cellules.

Pour la préparation des implants selon l'invention, différents types de gélifiants peuvent être employés. Les gélifiants sont utilisés pour l'inclusion des cellules dans une matrice ayant la constitution d'un gel, et pour favoriser l'ancrage des cellules sur le support, le cas échéant. Différents agents d'adhésion cellulaire peuvent donc être  
5 utilisés comme gélifiants, tels que notamment le collagène, la gélatine, les glycosaminoglycans, la fibronectine, les lectines, l'agarose etc.

Comme indiqué ci-avant, les compositions selon l'invention comprennent avantageusement un support permettant l'ancrage des cellules. Le terme ancrage désigne toute forme d'interaction biologique et/ou chimique et/ou physique entraînant  
10 l'adhésion et/ou la fixation des cellules sur le support. Par ailleurs, les cellules peuvent soit recouvrir le support utilisé, soit pénétrer à l'intérieur de ce support, soit les deux. On préfère utiliser dans le cadre de l'invention un support solide, non toxique et/ou bio-compatible. En particulier, on peut utiliser des fibres de polytétrafluoroéthylène (PTFE) ou un support d'origine biologique.

15 Les implants selon l'invention peuvent être implantés en différents sites de l'organisme. En particulier, l'implantation peut être effectuée au niveau de la cavité péritonéale, dans le tissu sous-cutané (région sus-pubienne, fosses iliaques ou inguinales, etc), dans un organe, un muscle, une tumeur, le système nerveux central, ou encore sous une muqueuse. Les implants selon l'invention sont particulièrement  
20 avantageux en ce sens qu'ils permettent de contrôler la libération du produit thérapeutique dans l'organisme : Celle-ci est tout d'abord déterminée par la multiplicité d'infection et par le nombre de cellules implantées. Ensuite, la libération peut être contrôlée soit par le retrait de l'implant, ce qui arrête définitivement le traitement, soit par l'utilisation de systèmes d'expression régulable, permettant d'induire ou de réprimer  
25 l'expression des gènes thérapeutiques.

La présente invention fournit ainsi des vecteurs viraux utilisables directement en thérapie génique, particulièrement adaptés et efficaces pour diriger l'expression de la glutathion peroxydase in vivo. La présente invention offre ainsi une nouvelle  
30 approche particulièrement avantageuse pour le traitement et/ou la prévention de nombreuses pathologies comme celles citées précédemment.

Les vecteurs adénoviraux selon l'invention présentent en outre des avantages importants, liés notamment à leur très haute efficacité d'infection des cellules cibles, permettant de réaliser des infections à partir de faibles volumes de suspension virale. De plus, l'infection par les adénovirus de l'invention est très localisée au site d'injection,  
35 ce qui évite les risques de diffusion aux structures cérébrales voisines. Ce traitement

peut concerner aussi bien l'homme que tout animal tel que les ovins, les bovins, les murins, les animaux domestiques (chiens, chats, etc), les chevaux, les poissons, etc.

On peut en outre, parfaitement envisager de procéder à une administration conjointe d'un adénovirus selon l'invention avec au moins un second adénovirus  
5 comportant un gène codant pour une des formes de la superoxyde dismutase ou la catalase.

Les exemples et la figure unique sont présentés ci-après à titre illustratif et non limitatif du domaine de l'invention.

10

#### FIGURE

Figure 1: Représentation de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase obtenue sur cellules 293 infectées par 0 à 500 pfu/cellule d'adénovirus recombinant  
15 codant pour la GPx ( AdGPx) ou la  $\beta$ galactosidase ( Ad $\beta$ gal).

#### Techniques générales de biologie moléculaire

Les méthodes classiquement utilisées en biologie moléculaire telles que les  
20 extractions préparatives d'ADN plasmidique, la centrifugation d'ADN plasmidique en gradient de chlorure de césium, l'électrophorèse sur gels d'agarose ou d'acrylamide, la purification de fragments d'ADN par électroélution, les extraction de protéines au phénol ou au phénol-chloroforme, la précipitation d'ADN en milieu salin par de l'éthanol ou de l'isopropanol, la transformation dans Escherichia coli, etc ... sont bien  
25 connues de l'homme de métier et sont abondamment décrites dans la littérature [Maniatis T. et al., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982; Ausubel F.M. et al. (eds), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987].

Les plasmides de type pBR322, pUC et les phages de la série M13 sont  
30 d'origine commerciale (Bethesda Research Laboratories).

Pour les ligatures, les fragments d'ADN peuvent être séparés selon leur taille par électrophorèse en gels d'agarose ou d'acrylamide, extraits au phénol ou par un mélange phénol/chloroforme, précipités à l'éthanol puis incubés en présence de l'ADN ligase du phage T4 (Biolabs) selon les recommandations du fournisseur.

35 Le remplissage des extrémités 5' proéminentes peut être effectué par le fragment de Klenow de l'ADN Polymérase I d'E. coli (Biolabs) selon les spécifications du fournisseur. La destruction des extrémités 3' proéminentes est effectuée en présence

de l'ADN Polymérase du phage T4 (Biolabs) utilisée selon les recommandations du fabricant. La destruction des extrémités 5' proéminentes est effectuée par un traitement ménagé par la nucléase S1.

5 La mutagénèse dirigée in vitro par oligodéoxynucléotides synthétiques peut être effectuée selon la méthode développée par Taylor et al. [Nucleic Acids Res. 13 (1985) 8749-8764] en utilisant le kit distribué par Amersham.

L'amplification enzymatique de fragments d'ADN par la technique dite de PCR [Polymérase-catalyzed Chain Reaction, Saiki R.K. et al., Science 230 (1985) 1350-1354; Mullis K.B. et Faloona F.A., Meth. Enzym. 155 (1987) 335-350] peut être  
10 effectuée en utilisant un "DNA thermal cycler" (Perkin Elmer Cetus) selon les spécifications du fabricant.

La vérification des séquences nucléotidiques peut être effectuée par la méthode développée par Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 5463-5467] en utilisant le kit distribué par Amersham.

## 15 **Exemples**

### **Exemple 1 : Protocole de construction du vecteur pLTRIX-bGPx**

Ce vecteur contient la séquence codant pour la GPx bovine sous contrôle du LTR du virus RSV, ainsi que des séquences de l'adénovirus permettant la recombinaison in  
20 vivo. L'ADNc utilisé est décrit dans [Mullenbach et al., Oxy-Radicals in Molecular Biology and Pathology, 313-326, (1988)].

L'ADN est inséré dans le site BamHI d'un plasmide Bluescript. Une séquence de polyadénylation a été introduite dans le site XhoI de ce plasmide. Ce dernier est identifié par SK-bGPx-PolyA.

25 Le vecteur pLTRIX-bGPx est obtenu en introduisant dans le site EcoRV du plasmide pLTRIX un insert obtenu par coupure de SK-bGPx-PolyA

### **Exemple 2 : Construction d'adénovirus recombinants contenant une séquence codant pour la glutathion peroxydase bovine.**

30 Le vecteur pLTRIX-bGPx est linéarisé et cotransfecté avec un vecteur adénoviral déficient, dans les cellules helper (lignée 293) apportant en trans les fonctions codées par les régions E1 (E1A et E1B) d'adénovirus.

Plus précisément, l'adénovirus Ad-bGPx a été obtenu par recombinaison homologue *in vivo* entre l'adénovirus mutant Ad-dl1324 (Thimmappaya et al., Cell 31 (1982) 543) et le vecteur pLTR IX-bGPx, selon le protocole suivant : le plasmide pLTR IX-bGPx et l'adénovirus Ad-dl1324, linéarisé par l'enzyme ClaI, ont été co-transfectés dans la lignée 293 en présence de phosphate de calcium, pour permettre la recombinaison homologue. Les adénovirus recombinants ainsi générés ont été sélectionnés par purification sur plaque. Après isolement, l'ADN de l'adénovirus recombinant a été amplifié dans la lignée cellulaire 293, ce qui conduit à un surnageant de culture contenant l'adénovirus défectif recombinant non purifié ayant un titre d'environ  $10^{10}$  pfu/ml.

Les particules virales sont ensuite purifiées par centrifugation sur gradient.

### Exemple 3 : Contrôle de l'expression *in vitro* de la GPx.

15

Pour chaque essais, un extrait ( 0,5% triton) est réalisé à partir de 300.000 cellules 293 infectées par 0 à 500pfu/cellule d'adénovirus recombinant codant pour la GPx ou la  $\beta$ galactosidase. L'activité enzymatique de la glutathion peroxydase est évaluée selon le protocole de Flohé et Günzler ( 1984, Methods in Enzymology, Vol; 105, pp 114-121). Le glutathion oxydé ( GSSG) formé au cours de la réaction GPx est réduit de manière constante par un excès d'activité glutathion réductase pour un niveau constant de glutathion réduit ( GSH ). L'oxydation simultanée de NADPH est suivie par spectrophotométrie.

20

La figure 1 rend compte des résultats obtenus.

### REVENDICATIONS

1. Adénovirus recombinant défectif comprenant au moins une séquence d'ADN codant pour tout ou une partie active d'une glutathion peroxydase ou l'un de ses dérivés.
- 5           2. Adénovirus selon la revendication 1 caractérisé en ce que la séquence d'ADN est une séquence d'ADNc.
3. Adénovirus selon la revendication 1 caractérisé en ce que la séquence d'ADN est une séquence d'ADNg.
- 10          4. Adénovirus selon la revendication 1, 2 ou 3 caractérisé en ce que la séquence d'ADN code pour une glutathion peroxydase bovine.
5. Adénovirus selon la revendication 1, 2 ou 3 caractérisé en ce que la séquence d'ADN code pour une glutathion peroxydase humaine.
- 15          6. Adénovirus selon la revendication 1 caractérisé en ce que la séquence d'ADN est une séquence antisens dont l'expression permet de contrôler l'expression du gène codant pour la glutathion peroxydase.
7. Adénovirus selon la revendication 6 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un gène codant pour un ARN antisens capable de contrôler la traduction de l'ARNm d'une glutathion peroxydase.
- 20          8. Adénovirus selon l'une des revendications 1 à 7 caractérisé en ce que la séquence d'ADN est placée sous le contrôle de signaux permettant son expression dans les cellules cibles.
9. Adénovirus selon la revendication 8 caractérisé en ce que les signaux d'expression sont choisis parmi les promoteurs viraux, de préférence parmi les promoteurs E1A, MLP, CMV et LTR-RSV.
- 25          10. Adénovirus selon la revendication 1 comprenant une séquence d'ADNg ou d'ADNc codant pour une glutathion peroxydase bovine sous le contrôle d'un promoteur LTR-RSV.

11. Adénovirus selon la revendication 1 comprenant une séquence d'ADNg ou d'ADNc codant pour une glutathion peroxydase humaine sous le contrôle d'un promoteur LTR-RSV.

5 12. Adénovirus selon l'une des revendications 1 à 11 caractérisé en ce qu'il est dépourvu des régions de son génome qui sont nécessaires à sa réplication dans la cellule cible.

13. Adénovirus selon la revendication 12 caractérisé en ce qu'il comprend les ITR et une séquence permettant l'encapsidation, et dans lequel le gène E1 et au moins un des gènes E2, E4, L1-L5 sont non fonctionnels.

10 14. Adénovirus selon la revendication 12 ou 13 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un adénovirus humain de type Ad 2 ou Ad 5 ou canin de type CAV-2.

15. Utilisation d'un adénovirus selon l'une des revendications 1 à 14 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement et/ou à la prévention des maladies neurodégénératives.

15 16. Utilisation selon la revendication 15 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement et/ou à la prévention des maladies de Parkinson, Alzheimer, Huntington, ALS, de la trisomie 21, de l'athérosclérose, des maladies cardiovasculaires, de la cirrhose du foie, du diabète, de la formation de cataracte, l'ischémie cérébrale, des traumatismes crâniens, de syndrome de détresse  
20 respiratoire (ARDS), des cancers ainsi que du processus de vieillissement.

17. Composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs adénovirus recombinants défectifs selon l'une des revendications 1 à 15.

18. Composition pharmaceutique selon la revendication 17 caractérisée en ce qu'elle est sous forme injectable.

25 19. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 17 à 18 caractérisée en ce qu'elle comprend entre  $10^4$  et  $10^{14}$  pfu/ml, et de préférence  $10^6$  à  $10^{10}$  pfu/ml adénovirus recombinants défectifs.

20. Cellule de mammifère infectée par un ou plusieurs adénovirus recombinants défectifs selon l'une des revendications 1 à 14.



21. Cellule selon la revendication 20 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule humaine.

22. Cellule selon la revendication 21 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule humaine de type rétinienne, fibroblaste, myoblaste, hépatocyte, cellule endothéliale, cellule Gliales ou kératynocyte.

23. Implant comprenant des cellules infectées selon les revendications 20 à 22 et une matrice extracellulaire.

24. Implant selon la revendication 23 caractérisé en ce que la matrice extracellulaire comprend un composé gélifiant choisi de préférence parmi le collagène, la gélatine, les glucosaminoglycans, la fibronectine, l'agarose et les lectines.

25. Implant selon les revendications 23 ou 24 caractérisé en ce que la matrice extracellulaire comprend également un support permettant l'ancrage des cellules infectées.

26. Implant selon la revendication 25 caractérisé en ce que le support est constitué préférentiellement par des fibres de polytétrafluoroéthylène.



1 / 1

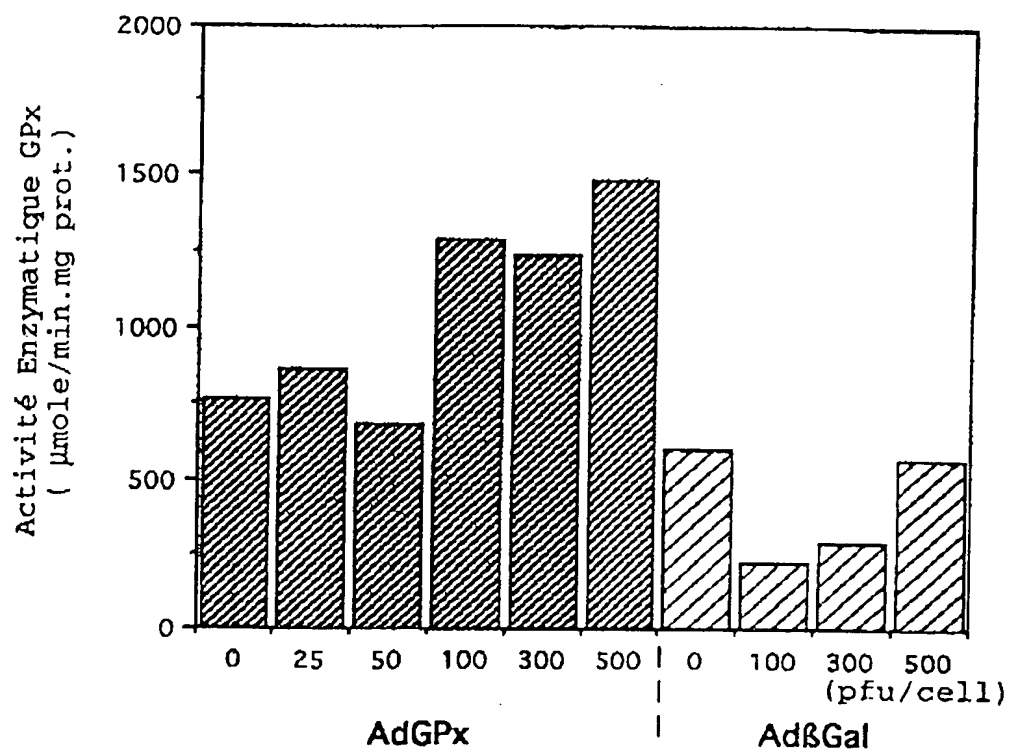


Figure 1



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern application No  
PCT/FR 95/01002

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 C12N15/86 A61K48/00 C12N9/08 A61K38/43

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 21, ARLINGTON, VIRGINIA US, page 1607 ERZURUM SC ET AL 'PROTECTION OF HUMAN ENDOTHELIAL-CELLS FROM OXIDANT INJURY BY ADENOVIRUS-MEDIATED TRANSFER OF THE HUMAN CATALASE CDNA' see the whole document ---	1-26
Y	BRAIN PATHOLOGY, vol. 4, page 3 AGUZZI A ET AL 'TRANSGENIC AND KNOCK-OUT MICE - MODELS OF NEUROLOGICAL DISEASE' see page 1, line 1 - page 7, left column, paragraph 2 --- -/--	1-26

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \* & \* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 October 1995

Date of mailing of the international search report

16.11.95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Gurdjian, D

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 95/01002

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO,A,93 20195 (FOX CHASE CANCER CENTER ;CORNELL RES FOUNDATION INC (US)) 14 October 1993 see claims 1-13; example 2 ---	1-26
Y	WO,A,88 07541 (CHIRON CORP) 6 October 1988 see page 25, line 18 - line 27; claims 1-18 ---	1-16
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 105, no. 19, 10 November 1986 Columbus, Ohio, US; abstract no. 166105, BELL, G. I. ET AL 'cDNA sequence coding for human kidney catalase' see abstract & NUCLEIC ACIDS RES. (1986), 14(13), 5561-2 CODEN: NARHAD;ISSN: 0305-1048, ---	1-7
Y	MEDECINE/SCIENCE, vol. 9, page 208 O.DANOS ET AL. 'REEIMPLANTATION de cellules génétiquement modifiées dans des néo-organes vascularisés' see the whole document ---	23-26
A	WO,A,90 06757 (UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 28 June 1990 see the whole document -----	1,15,17, 20

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern Application No

PCT/FR 95/01002

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9320195	14-10-93	AU-B- 3969993	08-11-93
WO-A-8807541	06-10-88	NONE	
WO-A-9006757	28-06-90	US-A- 5082670	21-01-92
		CA-A- 2005567	15-06-90
		EP-A- 0449948	09-10-91
		JP-T- 4503351	18-06-92





A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 6 C12N15/86 A61K48/00 C12N9/08 A61K38/43

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
CIB 6 C12N A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 21, ARLINGTON, VIRGINIA US, page 1607 ERZURUM SC ET AL 'PROTECTION OF HUMAN ENDOTHELIAL-CELLS FROM OXIDANT INJURY BY ADENOVIRUS-MEDIATED TRANSFER OF THE HUMAN CATALASE CDNA' voir le document en entier ---	1-26
Y	BRAIN PATHOLOGY, vol. 4, page 3 AGUZZI A ET AL 'TRANSGENIC AND KNOCK-OUT MICE - MODELS OF NEUROLOGICAL DISEASE' voir page 1, ligne 1 - page 7, colonne de gauche, alinéa 2 --- -/--	1-26

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- 'A' document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- 'E' document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- 'L' document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- 'O' document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- 'P' document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

'T' document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

'X' document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

'Y' document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

'&' document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

12 Octobre 1995

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

16.11.95

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Gurdjian, D

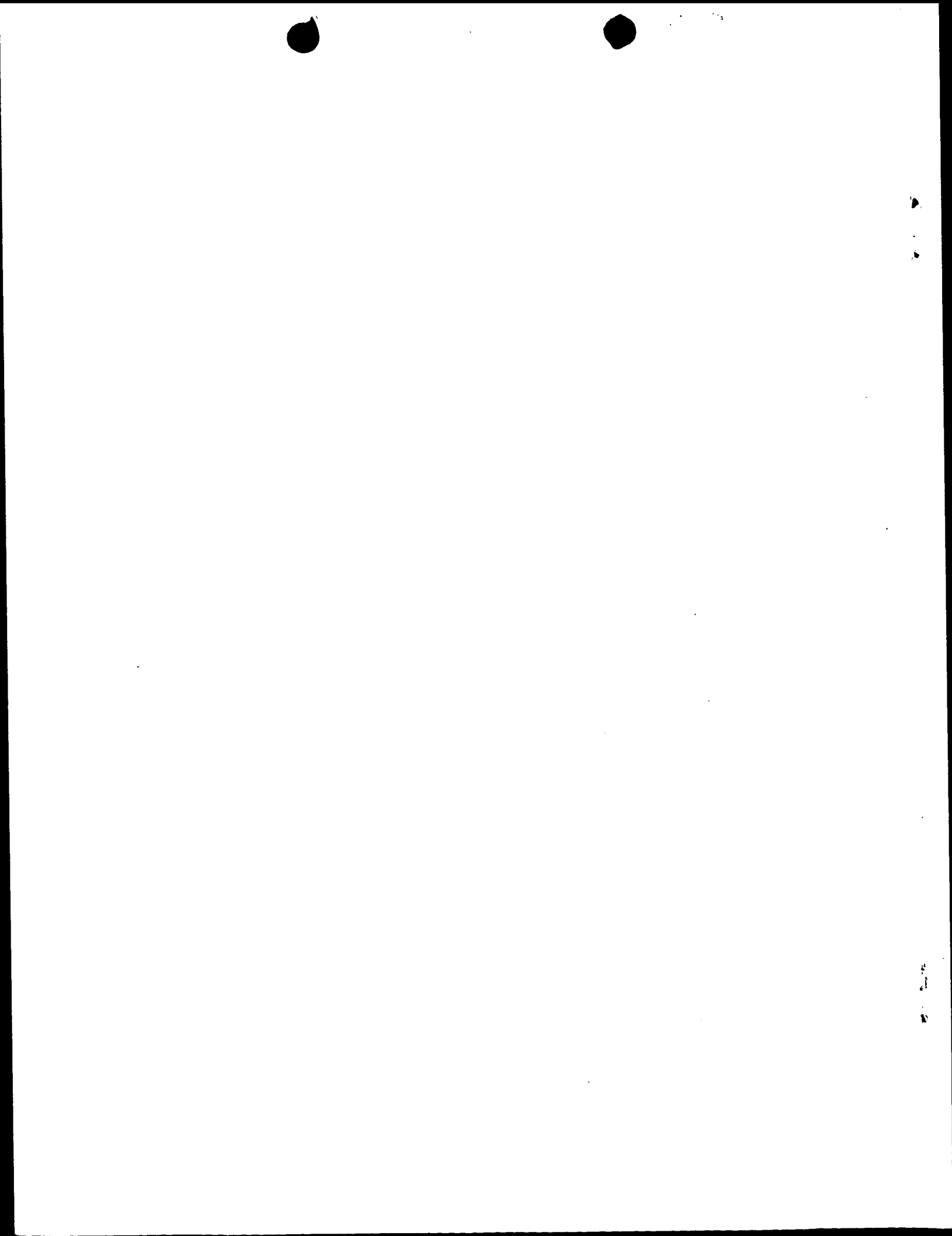
## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	WO,A,93 20195 (FOX CHASE CANCER CENTER ; CORNELL RES FOUNDATION INC (US)) 14 Octobre 1993 voir revendications 1-13; exemple 2 ---	1-26
Y	WO,A,88 07541 (CHIRON CORP) 6 Octobre 1988 voir page 25, ligne 18 - ligne 27; revendications 1-18 ---	1-16
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 105, no. 19, 10 Novembre 1986 Columbus, Ohio, US; abstract no. 166105, BELL, G. I. ET AL 'cDNA sequence coding for human kidney catalase' voir abrégé & NUCLEIC ACIDS RES. (1986), 14(13), 5561-2 CODEN: NARHAD; ISSN: 0305-1048, ---	1-7
Y	MEDECINE/SCIENCE, vol. 9, page 208 O.DANOS ET AL. 'REEIMPLANTATION de cellules génétiquement modifiées dans des néo-organes vascularisés' voir le document en entier ---	23-26
A	WO,A,90 06757 (UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 28 Juin 1990 voir le document en entier -----	1, 15, 17, 20

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No  
PCT/FR 95/01002

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9320195	14-10-93	AU-B- 3969993	08-11-93
WO-A-8807541	06-10-88	AUCUN	
WO-A-9006757	28-06-90	US-A- 5082670	21-01-92
		CA-A- 2005567	15-06-90
		EP-A- 0449948	09-10-91
		JP-T- 4503351	18-06-92



# PCT

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire <b>ST 94065</b>	<b>POUR SUITE</b> voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après <b>A DONNER</b>	
Demande internationale n° <b>PCT/FR95/01002</b>	Date du dépôt international (jour/mois/année) <b>26/07/95</b>	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année) <b>12/08/94</b>
Déposant <b>RHONE-POULENC RORER S.A. et al.</b>		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 3 feuilles.

☒ Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

1. ☐ Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre I).

2. ☐ Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre II).

3. ☐ La demande internationale contient la divulgation d'un listage de séquence de nucléotides ou d'acides aminés et la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage de séquence.

☐ déposé avec la demande internationale

☐ fourni par le déposant séparément de la demande internationale

☐ sans être accompagnée d'une déclaration selon laquelle il n'inclut pas d'éléments allant au-delà de la divulgation faite dans la demande internationale telle qu'elle a été déposée.

☐ transcrit par l'administration

4. En ce qui concerne le titre, ☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.

☐ Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

5. En ce qui concerne l'abrégé,

☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant

☐ le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

6. La figure des dessins à publier avec l'abrégé est la suivante:

Figure n°            ☐ suggérée par le déposant.

☐ parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.

☐ parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

☐ Aucune des figures n'est à publier.



A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 6 C12N15/86 A61K48/00 C12N9/08 A61K38/43

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12N A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 21, ARLINGTON, VIRGINIA US, page 1607 ERZURUM SC ET AL 'PROTECTION OF HUMAN ENDOTHELIAL-CELLS FROM OXIDANT INJURY BY ADENOVIRUS-MEDIATED TRANSFER OF THE HUMAN CATALASE CDNA' voir le document en entier ---	1-26
Y	BRAIN PATHOLOGY, vol. 4, page 3 AGUZZI A ET AL 'TRANSGENIC AND KNOCK-OUT MICE - MODELS OF NEUROLOGICAL DISEASE' voir page 1, ligne 1 - page 7, colonne de gauche, alinéa 2 --- -/--	1-26

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

12 Octobre 1995

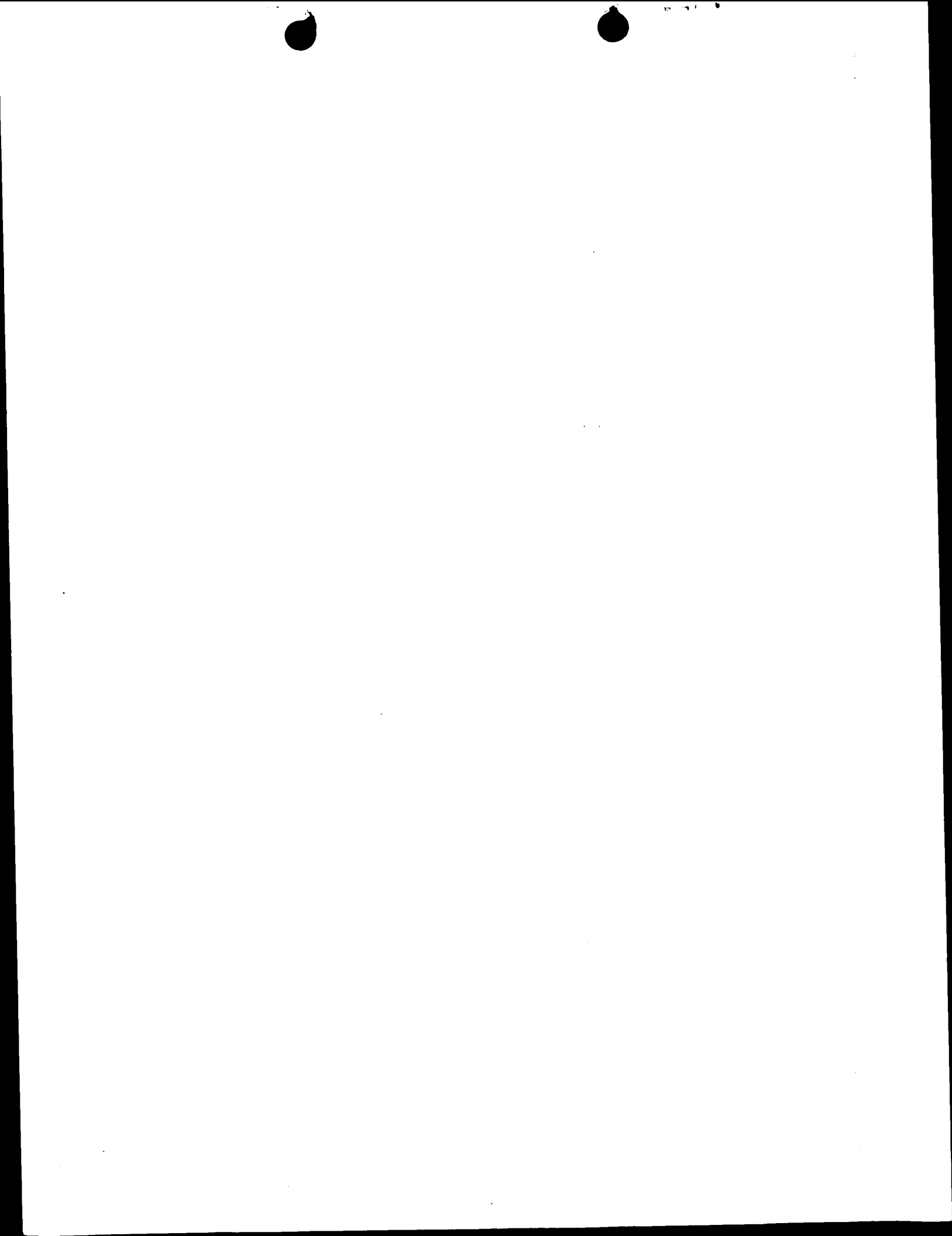
Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

16. 11. 95

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Gurdjian, D





C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	WO,A,93 20195 (FOX CHASE CANCER CENTER ; CORNELL RES FOUNDATION INC (US)) 14 Octobre 1993 voir revendications 1-13; exemple 2 ---	1-26
Y	WO,A,88 07541 (CHIRON CORP) 6 Octobre 1988 voir page 25, ligne 18 - ligne 27; revendications 1-18 ---	1-16
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 105, no. 19, 10 Novembre 1986 Columbus, Ohio, US; abstract no. 166105, BELL, G. I. ET AL 'cDNA sequence coding for human kidney catalase' voir abrégé & NUCLEIC ACIDS RES. (1986), 14(13), 5561-2 CODEN: NARHAD; ISSN: 0305-1048, ---	1-7
Y	MEDECINE/SCIENCE, vol. 9, page 208 O.DANOS ET AL. 'REEIMPLANTATION de cellules génétiquement modifiées dans des néo-organes vascularisés' voir le document en entier ---	23-26
A	WO,A,90 06757 (UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 28 Juin 1990 voir le document en entier -----	1, 15, 17, 20



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/JP 95/01002

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9320195	14-10-93	AU-B- 3969993	08-11-93
WO-A-8807541	06-10-88	NONE	
WO-A-9006757	28-06-90	US-A- 5082670	21-01-92
		CA-A- 2005567	15-06-90
		EP-A- 0449948	09-10-91
		JP-T- 4503351	18-06-92

